

Nina Kočevar¹, Radovan Komel²

Preiskava bolezenskih proteomov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in masno spektrometrijo

*Disease Proteome Analysis with Two-Dimensional Gel Electrophoresis
and Mass Spectrometry*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: proteom, elektroforeza, poliakrilamidni gel, spektrometrija – masna

Dvodimenzionalna gelska elektroforeza je ena izmed osnovnih tehnik proteomike. Namenjena je ločevanju proteinov. Kot pove že ime, jih s to tehniko ločujemo v dveh dimenzijah. Najprej se med izoelektričnim fokusiranjem ločijo glede na svojo izoelektrično točko, nato pa se med poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata ločijo še glede na svojo molekulsko maso. Končni rezultat je viden kot gel z ločenimi proteini v obliki okroglih lis. Te gele lahko z orodji bioinformatike računalniško analiziramo in s tem določimo zanimive lise (npr. tiste, ki se različno izražajo v primerjanih vzorcih). Izbrane lise nato izrežemo, razgradimo z encimom ter analiziramo in identificiramo s pomočjo masne spektrometrije. Tudi tu si pomagamo z bioinformatiko, in sicer ko primerjamo dobljene peptidne mase s tistimi iz podatkovnih zbirk. V prispevku metodološko opisujemo posamezne stopnje postopka preiskave proteomov, od priprave vzorca in dvodimenzionalne gelske elektroforeze do računalniške analize gelov in identifikacije proteinov z masno spektrometrijo. Prikazujemo tudi možnosti uporabe metode v biomedicini in dodajamo opis njene uporabe pri naši raziskavi onkogeneze želodčne sluznice.

ABSTRACT

KEY WORDS: proteome, electrophoresis, polyacrylamide gel, spectrum analysis – mass

A two-dimensional gel electrophoresis is one of the basic techniques of proteomics. It is used to separate proteins. As already hinted by the name, we are using the method to separate proteins in two dimensions. Firstly, they are separated during isoelectric focusing according to their isoelectric points and then according to their molecular weight during sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis – resulting in a gel with round spots of separated proteins. The method is usually used in combination with mass spectrometry and bioinformatics: the first one enables us to identify the desired proteins (i. e. those with differential expression in compared samples), and the second one enables us to use different computer programmes for determining the spots (proteins) with differential expression, as well as identifying them by using different databases. In this article we methodologically describe phases of proteome investigation, from sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis to gel analysis with mass spectrometry and protein identification. We are showing the possibilities of using the method in biomedicine, with particular focus on our research of oncogenesis at gastric mucosa.

¹ Nina Kočevar, univ. dipl. mikrobiol., Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

² Prof. dr. Radovan Komel, univ. dipl. kem., Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana.

UVOD

Proteom je popoln niz proteinov, najdenih v danem celičnem tipu v katerem koli (pato) fiziološkem stanju (1, 2). Informacija o njem je potrebna za razumevanje dinamičnih procesov v celicah (3). Nekateri avtorji uporabljajo tudi dokaj ohlapen izraz »proteom organizma«, vendar se moramo zavedati, da organizem sestavljajo različni organi in te različna tkiva, tkiva pa so organizirane skupine celic enakega tipa. Proteom se torej razlikuje med tkivi, različnimi stanji razvoja bolezni in med potekom zdravljenja. Razlike v proteinskem izražanju je mogoče analizirati in identificirati s pomočjo proteomike. Gre za skovanko besed protein in genomika ter pomeni analizo celotnih proteinskih ekstraktov celic, tkiv ali organov. Poslučuje se vrste različnih tehnik, osnovne pa so naslednje:

- dvodimenzionalna gelska elektroforeza ali tekočinska kromatografija (ločevanje proteinov),
- masna spektrometrija (identifikacija proteinov) in
- analiza dobljenih podatkov z orodji bioinformatike.

DVODIMENZIONALNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Dvodimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE) je metoda za ločevanje proteinov, ki jo je razvil Patrick H. O'Farrell (4), skozi čas pa se je izpopolnjevala. Kot že ime pove, proteine ločujemo v dveh dimenzijah. Najprej jih med izoelektričnim fokusiranjem (IEF) ločimo glede na njihovo izoelektrično točko. Proteini so namreč zaradi prostih aminokislinskih ostankov lahko neto pozitivno ali negativno nabiti ali nevtralni, kar se spreminja v odvisnosti od pH njihovega okolja. Med fokusiranjem se premikajo pod vplivom električnega polja v traku z imobiliziranim pH-gradientom (IPG). Gre za želatinast trak, prepojen z zaporedjem amfolitov (snovi, ki zagotavljajo vsaka »svoj« pH). V tem času postajajo proteini s sprejemanjem oz. oddajanjem protonov vedno manj nabiti, dokler se ne ustavijo v točki, kjer je njihov neto naboj 0 (število pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov je izenačeno s številom negativno nabitih). To je njihova

izoelektrična točka. Druga dimenzija elektroforeze je poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS-PAGE), kjer proteine ločujemo glede na njihovo molekularno maso. To naredimo tako, da jih prekrijemo z dodanim detergentom, natrijevim dodecil sulfatom (SDS – snov, ki daje izrazit negativen naboj polipeptidnim verigam, na katere se veže), jih s tem denaturiramo v iztegnjeno obliko in jim podelimo negativen naboj, ki je sorazmeren z njihovo maso. To med elektroforezo zagotavlja njihovo premikanje proti anodi (+ elektrodi) v odvisnosti od njihove velikosti oz. molekulske mase (neodvisno od njihove oblike). Pri tem potujejo po matriksu gela, ki nastane s polimerizacijo akrilamida in *N,N*-dimetil bisakrilamida (v nadaljevanju bisakrilamid) in vsebuje pore določenih dimenzij (5).

Pri sami metodi 2-DE sicer obstajajo splošna navodila o pripravi vzorcev in raztopin, vendar ta glede posameznih podrobnosti še vedno omogočajo dovolj prosto izbiro, da raziskovalci lahko iste vzorce pripravljajo na nekoliko različne načine, to je v skladu s potrebami in laboratorijskimi razmerami.

Priprava vzorcev

Najprej je potrebna priprava vzorca, kar pomeni:

- odvzem vzorca,
- rahlo ali grobo razbitje celic,
- pridobitev proteinov v raztopino,
- odstranjevanje motečih snovi in
- shranjevanje.

Metode, ki jih v tem delu izberemo, so odvisne od samega vzorca in vplivajo na končni rezultat (3). Najbolj ustaljen izbor za pripravo tkiva je trenje v terilnici s pestilom ob doličanju tekočega dušika. Dobljenemu prahu pa dodamo pufer za lizo iz 8 M uree, 4 % (w/v) 3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonata (CHAPS), 40 mM ditiotreitola (DTT) in 2 % (v/v) IPG-pufra (raztopina, ki vsebuje amfolite). Urea raztaplja in razvije (denaturira) proteine, detergent pripomore k raztapljanju in preprečuje agregacijo, ki bi sicer nastala zaradi hidrofobnih interakcij, reducent razbije disulfidne vezi proteinskih struktur, IPG-pufer pa še dodatno poveča topnost proteinov (5).

Naslednja stopnja je centrifugiranje za odstranitev netopnih snovi (celičnih ostan- kov); včasih je treba odstraniti še razne moteče spojine, kot so lipidi, nukleinske kisline, soli itd. Tu lahko uporabimo različna obarjanja, s katerimi proteine oborimo, nečistoče pa ostanejo topne v raztopini. Izbiramo lahko med obarjanjem z acetonom, trikloroacetno kislino (TCA) ali nasičeno raztopino amoni- jevega sulfata, oborjene proteine pa je nato treba ponovno raztopiti v primernem pufru. Lahko uporabimo tudi dializo ali komercial- no dostopne komplete, kot so 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare), ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) in 2-D Sample Prep Kit (Pierce).

Pripravljenemu vzorcu nato izmerimo proteinsko koncentracijo, saj je za analizo tre- ba vzeti pravšnjo količino proteinov, hkrati pa nam količinsko izenačenje med vzorci olajša tudi medsebojne primerjave dobljenih rezul- tatov. Na izbiro imamo sicer več tehnik, npr. merjenje koncentracije po Bradfordovi ali Lowryjevi metodi (6), vendar je treba upošte- vati, da vsebujejo pufri za 2-DE tudi spojine, ki lahko delujejo moteče na merjenje z izbra- no metodo. To lahko rešimo bodisi z izogiba- njem takšnim sestavinam pufov bodisi z dru- gače prilagojenim merjenjem koncentracije, kar je med drugim v svojem metodološkem prispevku opisal tudi Ramagli (7). V upora- bi so tudi že komercialno dostopni kompleti, ki upoštevajo sestavo pufov pri 2-DE, npr. 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

Če želimo analizirati le proteom posamez- nih delov celičnega lizata, lahko vzorec pred nadaljnjo uporabo frakcioniramo, npr. z di- ferenčnim centrifugiranjem (8).

Rehidracija in izoelektrično fokusiranje

Ko je vzorec pripravljen, lahko začnemo postop- pek fokusiranja in s tem ločevanja glede na izoelektrično točko proteinov. To lahko poteka v različnih napravah, kot so Ettan IPGphor (GE Healthcare) (slika 1), Multiphor (GE Health- care) in Protean IEF cell (Bio-Rad), z njim prilagojenimi postopki. Za ločevanje največ- krat uporabljamo IPG-trakove. Ti so komer- cialno dostopni in vsebujejo izsušen poliakri- lamidni gel, v katerega so kovalentno vgrajeni amfoliti, ki zagotavljajo pH-gradient. Razliku- jejo se tako po dolžini (7, 11, 13, 18 ali 24 cm)



Slika 1: Izaelektrični fokusirni sistem s keramičnimi nosilci Ettan IPGphor.

kot po pH-območju (npr. 3–10, 4–7), vsi pa morajo biti pred uporabo rehidrirani (3). To pomeni, da jih vsaj dvakrat po 10 minut nama- kamo v rehidracijski raztopini, bodisi v posebnih posodah bodisi v petrijevkah. Sestava rehidra- cijske raztopine je skoraj enaka sestavi usta- ljenega pufra, ki smo ga uporabili za lizo celic, vendar v malenkost drugačnih koncentraci- jah: 8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 0,5–2% (v/v) IPG-pufer, 40 mM DTT. Za spremljanje poteka IEF ji je dodana še sled bromofenolmodre- ga (5). Rehidracija IPG-trakov lahko poteka z vzorcem ali brez njega, na posebnem plad- nju ali v enakih nosilcih kot za fokusiranje



Slika 2: Keramični nosilci v škatli za shranjevanje. Keramični nosilci so podolgovate posode, v katere položimo IPG-trakove in nanje nanesimo vzorce v rehidracijski raztopini. V njih poteka izoelek- trično fokusiranje.

(sliki 2, 3) ter aktivno pod določeno napetostjo ali pasivno brez napetosti. Čas rehidracije in samega fokusiranja je odvisen od dolžine IPG-traku in količine vzorca. Gel se najprej rehidrira, nato pa se proteini premikajo po njem v električnem polju glede na svoj naboj, dokler vsak ne doseže »svoje« točke, ko je njegov skupni naboj enak 0 (izoelektrična točka), in se zato v tem delu traku ustali (fokusiranje).

Uravnoteženje in poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

Po izoelektričnem fokusiranju lahko trakove s proteini shranimo pri -70°C ali pa jih dalje s SDS-PAGE ločujemo glede na njihovo velikost. V tem primeru je najprej potrebno uravnoteženje (ekvilibracija), kjer z anionskim detergentom SDS proteine negativno nabijemo. Ustvarijo se negativno nabiti kompleksi protein-SDS, ki nato med elektroforezo potujejo po gelu, vlietem med stekleni plošči. Potujejo v smeri proti pozitivni anodi, in sicer tako, da se manjši proteini premikajo hitreje, večji pa počasneje (3). Ustaljena raztopina za uravnoteženje je iz 6 M uree, 30 % (v/v) glicerola, 50 mM Tris-HCl-pufra s $\text{pH} = 8,8$, 0,002 % bromofenolmodrega in 2 % (w/v) SDS, čemur je v prvi fazi dodan še 1 % (w/v) DTT, v drugi pa ga nadomesti 2,5 % (w/v) jodoacetamid (IAA). Urea in glicerol zagotavljata viskoznost in zmanjšujeta učinke elektroendoosmoze (izrazito gibanje vode, ki moti potek 2-DE), Tris-HCl ohranja gele v primernem pH-območju za elektroforezo, bromofenol služi za vizualno spremljanje poteka elektroforeze, DTT je dodan za redukcijo disulfidnih mostič-



Slika 3: Keramični nosilec z odprtim pokrovom.



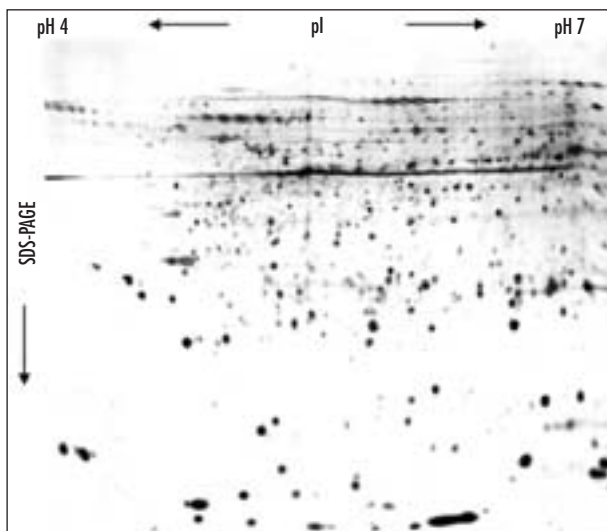
Slika 4: Sistem Ettan DALTsix s hladilnikom in usmernikom EPS 601.

kov proteinov, IAA pa prepreči reoksidacijo tiolnih skupin (5).

Elektroforeza je lahko navpična, kot je npr. pri sistemih EttanDALT (slika 4), ali pa vodoravna kot pri napravi Multiphor. Zanj lahko uporabljamo različne puferske sisteme. Najbolj ustaljen je Tris-glicinski, in sicer iz 25 mM Trisa, 192 mM glicina ter z dodatkom 0,1 % SDS (5). Izbiro imamo tudi pri gelih: lahko kupimo že narejene ali pa jih vlijemo sami, imajo lahko različne koncentracije akrilamida in bisakrilamida (njuno standardno razmerje za proteine je sicer 37,5 : 1), odločimo pa se lahko tudi za različno velikost in debelino gela.

Vizualizacija

Ko imamo proteine na gelu ločene v obeh dimenzijah, jih je treba vidno predstaviti. Rezultat je viden kot gel z bolj ali manj okroglimi lisami (slika 5). Uporabljamo predvsem barvanje s *Coomassie brilliant blue* (CBB) za preparativne gele z večjo količino vzorca in barvanje s srebrom (I) nitratom za analitske gele z manjšo količino vzorca. Še večjo občutljivost lahko dosežemo z uporabo barvil s fluorofori, kot so npr. barvila SYPRO. Alternativna možnost je prenos proteinov na membrano (3). Posebna oblika je diferenčna gelska elektroforeza (2D-DIGE), kjer s fluo-



Slika 5: 2-DE gel celične linije AGS.

rescentnima barviloma Cy3 in Cy5 različno označimo proteome dveh celičnih stanj (npr. normalno/patološko) pred samo 2-DE (9). Celične lizate nato zmešamo in nanesimo na en sam gel, s čimer zmanjšamo variabilnost med geli, do katere sicer lahko pride pri ločenih vzporednih elektroforezah enega in drugega vzorca. Več o pozitivnih in negativnih straneh različnih metod barvanj proteinov je napisano v preglednem članku Millerja in sodelavcev (10).

Analiza elektroforeznih gelov (elektroferogramov)

Da lahko obarvane gele v naslednji fazi računalniško analiziramo, jih je treba digitalizirati z optičnim čitalcem. Analizo nam omogočajo različni programi, kot so Melanie (GeneBio), ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare), PDQuest (Bio-Rad), Delta2D (Decodon) itd. Z njihovo pomočjo določimo lise oz. proteine, ki se različno izražajo in so zato zanimivi za identifikacijo. Med seboj primerjamo gele različnih stanj, npr. »zdravega« vzorca s patološkim, vzorec pred zdravljenjem in po njem ... Gele najprej virtualno obarvamo (npr. gel »zdravega« vzorca z oranžno, patološkega pa z modro), lise na njih med seboj poravnamo in nato primerjamo njihove relativne intenzitete, ki jih izračuna računalnik. Pri 2D-DIGE (različno barvanje vzorcev in skupna elektro-

foreza na enem samem gelu) to nalogo opravi z računalnikom povezan optični čitalec, ki iz razlik v obarvanosti posameznih lis ugotovi in izračuna razlike v vsebnosti posameznih proteinov v enem in drugem vzorcu.

MASNA SPEKTROMetriJA

Gel, ki ga dobimo kot rezultat 2-DE, vsebuje proteine v obliki lis. Iz njega lahko želeno liso izrežemo, razgradimo v peptide z encimom, npr. s tripsinom, in identificiramo s pomočjo masne spektrometrije. Začetki metode segajo v prejšnje stoletje k raziskavam J. J. Thompsona in F. W. Astona (11). Z njo analiziramo produkte preko tvorbe ionov v plinskem stanju, nadaljnje masne separacije le-teh glede na njihovo razmerje mase z nabojem (m/z) in detekcije. To se dogaja v masnem spektrometru, ki je sestavljen iz ionskega izvora, masnega analizatorja in detektorja (slika 6). V ionskem izvoru molekule izbranih spojin pretvorimo v ionsko obliko, v masnem analizatorju nastale ione ločimo glede na razmerje m/z in jih v zadnji stopnji masnospektrometrične analize zaznamo z detektorjem (12).

Glede na način ionizacije in vrsto masnih analizatorjev poznamo različne tipe masnih spektrometrov. Vzorec lahko ioniziramo s pomočjo elektronov (EI, angl. *electron impact ionization*), kemijske reakcije v plinski fazi



Slika 6: Shema poteka masnospektrometrične analize.

(CI, angl. *chemical ionization*), močnega električnega polja (FD, angl. *field desorption*, FI, angl. *field ionization*) (13) ... V zadnjem času sta se najbolj razmahnila dve t. i. mehki tehniki (molekule med procesom ionizacije ostanejo razmeroma intaktne), in sicer:

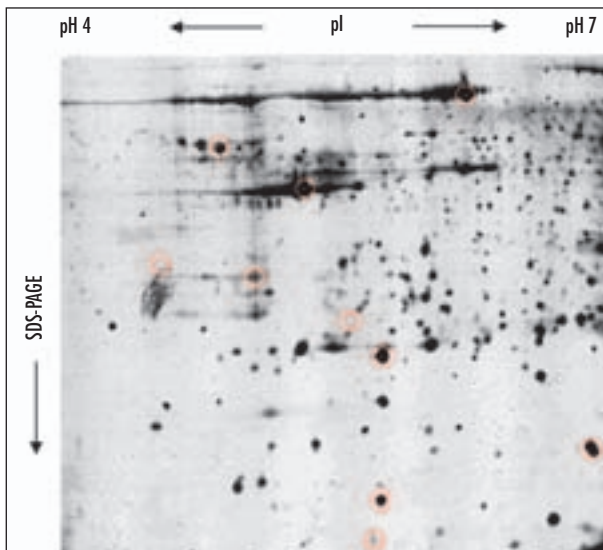
- ionizacija z desorpcijo v matriksu z laserjem (MALDI, angl. *matrix assisted laser desorption/ionization*) in
- ionizacija z razprševanjem (ESI, angl. *electrospray ionisation*) (12).

Pri prvi (MALDI) encimsko dobljene peptidne fragmente zmešamo z matriksom iz nizkomolekularne organske kisline, da z njim kokristalizirajo. Nato jih ioniziramo z laserskim žarkom, pri čemer matriks pobere večino laserske energije (s tem tudi zaščiti vzorec). Ko ionizira in se zaradi segrevanja razširi v plinsko fazo, s seboj pobere še molekule vzorca in jim preda del svojega naboja (jih ionizira). Nastajajo večinoma protonirani oz. deprotonirani ioni z enim nabojem v ob-

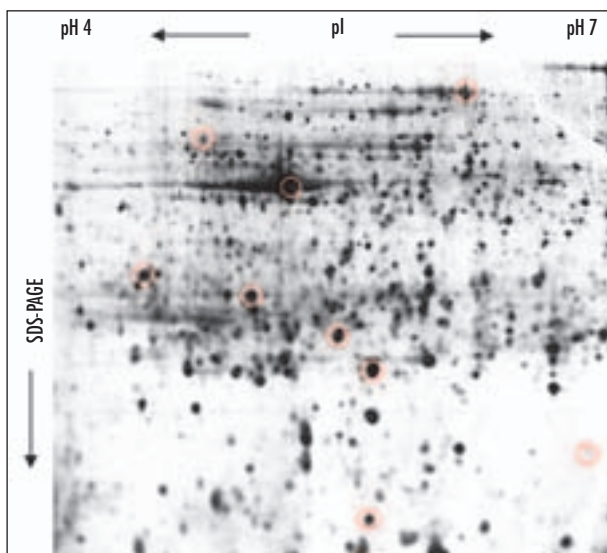
liki $[M + H]^+$ ali $[M - H]^-$ ($M =$ molekula). Pri drugi metodi (ESI) pa peptidno mešanico v raztopini potiskamo skozi kapilarno ali iglo, katere konica je pod visoko napetostjo. Temu sledi tvorba malih nabitih kapljic (aerosol), ki potujejo k nasprotno nabiti elektrodi. Med tem časom iz njih tudi zaradi dotoka vročega dušika izhlapeva topilo. Kapljice se manjšajo, dokler ne ostanejo le ioni vzorca, ki potujejo dalje v vmesno vakuumsko področje in naprej v masni analizator. Nastali ioni so lahko enojno ali večkrat nabiti, v obliki $[M + nH]^n+$ ali $[M - nH]^n-$. Za pionirsko delo pri razvoju in uporabi teh dveh teknik v masni spektrometriji sta Koichi Tanaka (MALDI) in John Fenn (ESI) leta 2002 prejela Nobelovo nagrado za kemijo (11).

Poleg različnih ionskih izvorov obstajajo tudi različni tipi masnih analizatorjev. Najpogostejši so:

- analizatorji na čas preleta ionov (TOF, angl. *time of flight*),
- kvadrupolni analizatorji (angl. *quadrupole*),



Slika 7: 2-DE gel normalnega vzorca tkivnega para 1. Z rdečo so obkrožene lise, ki smo jih poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS.



Slika 8: 2-DE gel tumorskega vzorca tkivnega para 1. Z rdečo so obkrožene lise, ki smo jih poslali na identifikacijo z MALDI-TOF-MS.

- ionske pasti (angl. *ion trap*) in
- ionsko ciklotronsko resonančni analizatorji s Fourierjevo transformacijo (FT-ICR, angl. *Fourier-transform ion cyclotron resonance*) (11, 12).

Analizator TOF je med najpreprostejšimi: nastale ione peptidov pospešimo z napestostjo in jih usmerimo v dolgo cev, ki je pod vakuumom. Tam se različno hitro premikajo glede na svojo maso in naboj. Meri se njihov čas prihoda do detektorja. V instrumentih z masnim analizatorjem TOF je najpogosteje uporabljen ionski izvor MALDI, s katerim lahko analiziramo biomolekule z molekulske maso 10000 in več. Kvadrupolni analizator je sestavljen iz štirih vzporednih kovinskih palic, nameščenih okoli navidezne centralne osi, tako da imata para palic nasprotni napestosti. Med njimi je ustvarjeno dinamično električno polje, ki deluje kot filter in dovoljuje prehod le ionom določenih razmerij m/z . Kvadrupolni analizator je pogosto združen z ESI. Ionska past je svoje ime dobila po tem, da ujame ione v nekakšno past znotraj oscilirajočega električnega polja. Ioni z različnimi razmerji m/z vstopijo hkrati, a izstopijo ob različnih napestostih in s tem ob različnih časih. Tudi ta analizator je pogosto spojen z ESI. Instrument FT-ICR je vrsta ionske pasti iz kubične celice znotraj močnega mag-

netnega polja, v kateri se ioni gibajo ciklotronsko (v krožnih orbitah) v ravnini, pravokotni na magnetno polje. Nanje vpliva tudi električna napestost na obodnih ploščah, prav tako pravokotnih na magnetno polje. Detekcija poteka preko določitve frekvence obhoda ionov mimo sprejemnika.

Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo lahko poteka po dveh metodologijah (12): s tvorbo in analizo prstnih odtisov peptidnih mas (angl. *peptide mass fingerprinting*) ali z določanjem aminokislinskega zaporedja peptidov. Pri prvi dobljene peptidne mase po masni spektrometriji primerjamo s seznamom pričakovanih peptidnih mas iz proteinske podatkovne zbirke. V tem primeru se po navadi uporabljata ločevanje proteinov z 2-DE in masna spektrometrija po metodi MALDI-TOF. Druga metodologija pa se izvaja z uporabo tandemске masne spektrometrije (MS/MS), s katero dobljene peptidne ione s pomočjo plina še dalje razgradimo (3). Več o masni spektrometriji v povezavi z natančnim merjenjem mase je napisano v preglednem članku Liuja in sodelavcev (14), o omejitvah in pasteh takšne proteinske identifikacije pa v članku Lubeca in Afjehi-Sadatove (15).

Za identifikacijo na novo odkritih, še nepoznanih proteinov lahko uporabimo tudi določanje aminokislinskega zaporedja N-koncev

po Edmanu. Postopek poteka v aminokislinskem sekvenatorju, ki s kemičnim postopkom avtomatično aminokislino za aminokislino razgrajuje proteine in peptide z njihovega N-konca. Produkte (aminokislino) navadno ločimo in identificiramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ki je sestavni del naprave. Metoda ima, kot že rečeno, posebno vrednost za *de novo* določanje zaporedja še neopredeljenih (novoodkritih) proteinov (3).

BIOINFORMATIKA

Z 2-DE navadno ločimo na stotine ali tisoče različnih proteinov celičnega proteoma, ki jih je v nadaljevanju potrebno določiti in identificirati. Za upravljanje in interpretacijo velikih količin podatkov, ki so rezultat analize proteinov, je proteomika odvisna od bioinformatike. Ta veda vključuje:

- različne pristope za analizo zaporedij,
- iskanje po podatkovnih zbirkah zaporedij,
- napoved proteinske strukture,
- brskanje po podatkih in literaturi za funkcionalne lastnosti proteinov ...

Obstaja že kar nekaj programskih oprem za to področje, poleg že prej omenjenih še npr. Msight (dostopno na <http://www.expasy.org/Msight>), InsPecT (dostopno na <http://peptide.ucsd.edu/inspect.py>), Aldente (*GeneBio*), DeNovoX (*Thermo Scientific*), RelEx (dostopno na <http://fields.scripps.edu/relex>), MS-Pattern (dostopno na <http://prospector.ucsf.edu>), Entrez (dostopno na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), SPLASH (dostopno na <http://oncoproteomics.nus.edu.sg/splash>) itd., njihov razvoj pa je šele v zgodnji fazi (2).

Bioinformatiko uporabimo že pri računalniški analizi gelov za določanje različno izraženih lis in kasneje pri identifikaciji proteinov iz teh lis z masno spektrometrijo. V prvem primeru se uporabljajo računalniški programi, s katerimi lahko primerjamo med seboj dva ali več gelov s proteini iz različnih fizioloških stanj vzorcev. Med seboj jih najprej poravnamo in nato gledamo, katere lise so različno izražene. V drugem primeru pa lahko vzorec dobljenih peptidnih mas primerjamo s seznamom pričakovanih mas iz proteinske podatkovne zbirke. Ker je bioinformatika nepogreš-

ljivi del proteomike, je še toliko bolj pomembno, da so njena orodja pravilno uporabljena. Več o tem je napisano v preglednem članku Birona in sodelavcev (16).

UPORABNOST 2-DE V KOMBINACIJI Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Samo znanje o genih in njihovem izražanju ne zadostuje za razumevanje celične biologije, saj celice vsebujejo več proteinov kot genov (3). To lahko pripišemo alternativnemu izrezovanju intronov (17, 18), kjer iz prepisa enega gena nastane več različic zrele mRNA in posledično proteinov, ali posttranslacijskim modifikacijam (19, 20, 21), ki kemično spremenijo proteinsko strukturo, tako da nastanejo modificirane različice, ter različnim agregacijam različnih vrst proteinov (protein-skih podenot). Zato je proučevanje proteinov pomembno. Z 2-DE v kombinaciji z masno spektrometrijo ugotavljamo tako vrstno in količinsko sestavo proteomov kot tudi razlike v izražanju nizov proteinov v različnih fizioloških razmerah. Iščemo razlike v proteinskem izražanju med različnimi stanji bolezni ali med potekom zdravljenja, ugotavljamo potencialne biološke označevalce (indikatorje, ki jih lahko kvantificiramo za različna bolezenska stanja), iščemo terapevtske tarče (za razvoj novih zdravil s ciljanim delovanjem), razvijamo nove diagnostične in prognostične postopke (molekularna diagnostika) (22).

Ena izmed najbolj preučevanih bolezni s kombinacijo 2-DE in masne spektrometrije je rak. Je posledica nepravilnega delovanja regulatornih mehanizmov, ki nadzorujejo obnašanje normalne celice (23). Raziskovalci s primerjanjem proteinskih profilov rakavih in nerakavih vzorcev analizirajo različna tkiva: ledvica (24), jetra (25), pljuča (26, 27), želodec (28–30). Našli so že veliko proteinov, ki so imeli bodisi povišano bodisi znižano izražanje v tumorjih. Nekatere sta v preglednem članku predstavila Kuramitsu in Nakamura (31).

Poleg primerjav zdravih tkiv z bolnimi raziskovalci s pomočjo 2-DE ustvarjajo tudi proteomske karte, s katerimi dobijo podatke o tem, kateri proteini se nahajajo v določenih

tkivih. Primer izdelave takšne karte za želodca je opisal Ha s sodelavci (32).

Za proteomsko analizo lahko uporabimo tudi celične linije. Na njih lahko proučujemo vpliv različnih snovi, npr. vpliv prevelike količine železa na celice človeškega hepatoma HepG2 (33), ali vpliv posameznih genov, npr. vpliv aktivacije p53 na proteinsko ekspresijo črevesnih karcinomskih celic HCT116 (34). Analizirali so tudi že proteome bakterij, npr. *Mycobacterium tuberculosis* (35), in praživali, npr. *Entamoeba histolytica* (36).

NAŠE IZKUŠNJE

Možnosti uporabe proteomskih pristopov z 2-DE je torej veliko. Enega smo preizkusili tudi na Medicinskem centru za molekularno biologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (37). Analizirali smo različno izražene proteine pri tumorskih in njim prilegajočih se normalnih vzorcih želodčne sluznice, prejetih z Oddelka za patologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani. Zmrznjene koščke tkiv smo zdrobili v terilnici s pestilom ob dolivanju tekočega dušika in dobljeni prah raztopili v pufuru iz 10 mM fosfatnega pufra (PBS), 10 mM etilendiamintetraoetne kisline (EDTA), 10 mM glicerola in 0,01 % nonideta P-40 (NP-40). Netopne ostanke smo odstranili s centrifugiranjem pri 13.000 vrtljajih/min. Pri tem smo preizkusili različne čase centrifugiranja, in sicer 15 min in 1 h; zadnje se je izkazalo za boljše. V nadaljevanju smo nekatere vzorce tudi obarjali, in sicer z acetonom, TCA ali nasičeno raztopino amonijevega sulfata. Za najuspešnejše se je izkazalo obarvanje z acetonom in raztapljanje dobljenega peleta v pufuru iz 9 M uree in 4 % CHAPS. Koncentracijo proteinov smo merili s kompletom *BCA*TM Protein Assay Kit (Pierce). Za primerjalno analizo smo vzeli bodisi enak volumen vzorcev (10 µL) bodisi enako skupno maso proteinov (100 µg) v vzorcih. IEF je potekalo v napravi IPGphor II IEF (GE Healthcare) (slika 1) v keramičnih nosilcih (sliki 2 in 3). Uporabili smo 24 cm dolge IPG-trakove s pH-območjem 4–7. Rehidracijo smo izvedli delno pasivno (10 h) in delno aktivno (2 h) ter fokusirali do skupne vsote 64 kVh. IPG-trakove smo nato uravnovežili dvakrat po 15 minut z 2 % ali s 4 % SDS; zadnje se je izkazalo za uspešnejše. Drugo dimenzijo

smo opravili v sistemu Ettan DALTSix (GE Healthcare) (slika 4) z 10 % ali 12 % geli; zadnji so omogočili lepšo razporeditev proteinov. V Tris-glicinskem pufrskem sistemu smo uporabili 0,1 % ali 0,2 % SDS; zadnje se je izkazalo za boljše. Elektroforeza je potekala približno 16 h z močjo 2 W/gel. Dobljene gele smo pobarvali s srebrovim nitratom po protokolu, skladnem z masno spektrometrijo (38). Računalniško smo jih analizirali s programom Delta2D (Decodon) in določili lise oz. proteine z različnim izražanjem. Nekaj smo jih poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo po metodi MALDI-TOF na Mednarodni center za gensko inženirstvo in biotehnologijo (ICGEB, angl. *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*) v Trst (sliki 7 in 8). Izbrali smo različno izražene proteine iz različnih pH-območij in velikosti, ki so bili na gelih dovolj dobro vidni. Na ICGEB so jih identificirali kot:

- prekurzor alfa-1-antitripsina,
- glutation S-transferazo P (GST P),
- izoobliko 2 sterilnega alfa in TIR motiv-vsebujočega proteina 1,
- prekurzor transtiretina,
- protein S100-A9,
- kloridni intracelularni kanalni protein 1 (CLIC1) in
- citoplazemski aktin 1 (beta aktin).

Prvi štirje izmed naštetih proteinov imajo znano izražanje v tumorskem tkivu, naslednji trije pa povišanega. Citoplazemski aktin 2 (gama aktin) so identificirali v dveh lisah, od katerih je ena imela znižano in druga povišano izražanje v tumorskem tkivu. Nekatere izmed dobljenih proteinov smo zasledili tudi v drugih raziskavah želodčnega raka z 2-DE. Prav tako kot v našem laboratoriju so za CLIC1 Chen in sodelavci (29) ugotovili povišano izražanje v tumorskem tkivu. Protein naj bi bil ionski kanalček, ki naj bi služil za vzdrževanje ionske homeostaze, nadzor volumna celice in transepitelijski transport. Ugotovili so tudi povezavo povišanega izražanja tega proteina z metastaziranjem v limfne vozle, limfatično invazijo, perinevralno invazijo in s slabšim preživetjem. Pogosto je omenjena GST P, vendar se podatki o njenem izražanju razlikujejo: tako v našem primeru kot v članku Yoshihara in sodelavcev (30) je imela znižano izražanje

v tumorskem tkivu, Chen in sodelavci (29) pa so ugotovili ravno obratno. GST katalizira konjugacijo reduciranega glutationa do velikega števila hidrofobnih elektrofilov, prispeva pa tudi k detoksifikaciji karcinogenov. Še en pogosto najdeni protein v različnih študijah je alfa-1-antitripsin. Ryu in sodelavci (39) ter Chen in sodelavci (29) so poročali o njegovem znižanem izražanju v tumorskem tkivu. Protein deluje kot inhibitor elastaz. V naših gelih

smo našli prekurzor alfa-1-antitripsina, in sicer z znižanim izražanjem v tumorskem tkivu.

ZAKLJUČKI

2-DE v kombinaciji z masno spektrometrijo in bioinformatiko predstavlja učinkovito orodje za odkrivanje sprememb izražanja proteinov v celicah. Uporabna je na različnih področjih biomedicine.

LITERATURA

1. Abbot A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature* 1999; 402: 715–20.
2. Brusci V, Marina O, Wu CJ, et al. Proteome informatics for cancer research: from molecules to clinic. *Proteomics* 2007; 6: 976–91.
3. Wittmann-Liebold B, Graack H-R, Pohl T. Two-dimensional gel electrophoresis as a tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 2006; 17: 4688–703.
4. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 10: 4007–21.
5. GE Healthcare. 2-D electrophoresis. Principles and methods. Little Chalfont, GE Healthcare UK Ltd; 2004. Dosegljivo na: [http://www5.gelifsciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/\\$file/80642960.pdf](http://www5.gelifsciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/$file/80642960.pdf)
6. Okotucu B, Dinçer A, Habib O, et al. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J Biochem Biophys Methods* 2007; 70: 709–11.
7. Ramagli LS. Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. *Methods Mol Biol* 1999; 112: 99–103.
8. Starita-Geribaldi M, Thaoan-Scarzello S, Le Blanc M, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the protease SP220K, a renal cell carcinoma marker. *Bioseparation* 2000; 9: 133–44.
9. Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 38–43.
10. Miller I, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006; 6: 5385–408.
11. Lane CS. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 848–69.
12. Kicman AT, Parkin MC, Iles RK. An introduction to mass spectrometry based proteomics – Detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Moll Cel Endocrinol* 2007; 260–62: 212–27.
13. Hesse M, Meier H, Zeeh B. Spectroscopic methods in organic chemistry. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1997.
14. Liu T, Belov ME, Jaitly N, et al. Accurate mass measurements in proteomics. *Chem Rev* 2007; 107: 3621–53.
15. Lubec G, Afjehi-Sadat L. Limitations and pitfalls in protein identification by mass spectrometry. *Chem Rev* 2007; 107: 3568–84.
16. Biron DG, Brun C, Lefevre T, et al. The pitfalls of proteomic experiments without the correct use of bioinformatics tools. *Proteomics* 2006; 6: 5577–96.
17. Artamonova II, Gelfans MS. Comparative genomics and evolution of alternative splicing: the pessimists' science. *Chem Rev* 2007; 107: 3407–30.
18. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 2003; 302: 2141–4.
19. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 2004; 8: 33–41.
20. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720–30.
21. Chen G, Gharib TG, Huang C-C, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 304–13.
22. Dhamoon AS, Kohn AC, Azad NS. The ongoing evolution of proteomics in malignancy. *Drug Discov Today* 2007; 12: 700–8.
23. Cooper GM. *The Cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington, DC: The American Society for Microbiology; 2000.
24. Perroud B, Lee J, Valkova N, et al. Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling. *Mol Cancer* 2006; 5 (64). Dosegljivo na: <http://www.molecular-cancer.com/content/5/1/64>

25. Yoon G-S, Lee H, Jung Y, et al. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1117-20.
26. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, et al. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas as a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1157-63.
27. Chen G, Gharib TG, Wang H, et al. Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13537-42.
28. Ebert MPA, Krüger S, Fogeron M-L, et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics* 2005; 6: 1693-704.
29. Chen C-D, Wang C-S, Huang Y-H, et al. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics* 2007; 1: 155-67.
30. Yoshihara T, Kadota Y, Yoshimura Y, et al. Proteomic alteration in gastric adenocarcinomas from Japanese patients. *Mol Cancer* 2006; 5 (75). Dosegljivo na: <http://www.biomedcentral.com/1476-4598/5/75>
31. Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers. *Proteomics* 2006; 6: 5850-61.
32. Ha GH, Lee SU, Kang DG, et al. Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Electrophoresis* 2002; 15: 2513-24.
33. Petrak J, Myslivcova D, Man P, et al. Proteomic analysis of iron overload in human hepatoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G1059-66.
34. Roblick-Rahman R, Roblick UJ, Hellman U, et al. p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5401-6.
35. Ryoo SW, Park YK, Park S-N, et al. Comparative proteomic analysis of virulent Korean *Mycobacterium tuberculosis* K-strain with other *Mycobacteria* strain following infection of U-937 macrophage. *J Microbiol* 2007; 45: 268-71.
36. Leitsch D, Kolarich D, Wilson IBH, et al. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: a central role for thioredoxin reductase. *PLoS Biol* 2007; 5: 1820-34.
37. Kočevar N. Preiskava proteoma z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo pri raku želodca: optimizacija postopka in preliminarni poskusi [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
38. Mortz E, Krogh TN, Vorum H, et al. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* 2001; 1: 1359-63.
39. Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, et al. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 505-9.

Prispelo 26. 2. 2008